

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik Leipzig
[Direktor Professor Dr. *Morawitz* †].)

Über das Wachstum menschlichen Knochenmarks in vitro.

1. Mitteilung.

Von

Georg Weitzmann und Eva Posern.

Mit 8 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 15. Januar 1937.)

In unserer ersten zusammenfassenden Arbeit über die Methoden von Züchtung von Geweben der menschlichen blutbildenden Organe gaben wir auch einen Überblick über das Schicksal menschlichen Knochenmarks in vitro. In keinem anderen Gewebe lassen sich so viele Arten und Stadien der Zellreifung erfassen wie im Knochenmark als der wichtigsten Stätte der Blutbildung. Es lag nahe, nachdem die Erkennung und Differenzierung der Zellen aus dem strömenden Blute fast restlos erschöpft worden ist, die Aufmerksamkeit dem Knochenmark zu schenken. Besonders ausgebaut wurde die Diagnosenstellung der Blutkrankheiten aus dem Knochenmark, nachdem die Sternalpunktion, die besonders an die Namen von *Schulten* und *Henning* geknüpft ist, Eingang in die Klinik gefunden hat und heute fast als unerlässlich bei jedem vollständigen Blutstatus gefordert wird. Die Beobachtung der Zellen des strömenden Blutes, wie die Präparate aus dem Sternalpunktat, geben jedoch nur Momentaufnahmen aus dem krankhaften Geschehen. Es lassen sich zweifellos in den meisten Fällen durch oft wiederholte Blutbilder die Momentaufnahmen zu einem vollständig abgerundeten Bild zusammensetzen. Schwieriger wird es jedoch, wenn Sternalmark des öfteren entnommen werden soll, um auch gleichzeitig eine Vorstellung über das Geschehen an der Stelle der Blutbildung selbst zu gewinnen.

Das Wachstum des Knochenmarks in vitro fand schon immer regstes Interesse aller Gewebezüchter. Der Versuch erscheint verständlich, mit Hilfe der Gewebezüchtung einen neuen Einblick in das Zustandekommen der Blutkrankheiten zu gewinnen. Notwendige Voraussetzung dafür sind neben einer guten, nicht zu schweren Technik eine genaue Kenntnis des Wachstums normalen menschlichen Knochenmarks. In dieser und folgenden Arbeiten soll versucht werden, die Entwicklung und das Wachstum bestimmter Zellgruppen in vitro gezüchteten Knochenmarks zu erfassen. Das für unsere erste Arbeit (*Meier, Posern, Weitzmann*) gewonnene Material stammt ausschließlich von durch Operation

gewonnenen Rippen. Es ist uns jetzt auch gelungen, das Mark des Sternum zur Züchtung zu benutzen. Die Ausarbeitung dieser Methodik erscheint uns deswegen von Bedeutung, weil für die Erfassung pathologischer Vorgänge Knochenmark aus Rippen so gut wie nicht zur Verfügung steht. Die Vorteile der Verwendung von Sternalpunktat sind: 1. die Auswahl der Patienten, deren Knochenmark gezüchtet werden soll, kann selbst geschehen. 2. Es können von klinisch als sicher pathologisch erfaßten Zellen Explantate gezüchtet werden. 3. Von ein und demselben Patienten können in Zeitabständen wiederholte Punktationen verwandt werden. Bei der Benutzung des Knochenmarks der Rippe bestehen naturgemäß Schwierigkeiten in der Auswahl der Patienten betreffend Alter und Krankheit, besonders dann, wenn das Material von einer anderen Klinik stammt. Alle diese Schwierigkeiten bestehen nicht bei der Verwendung von Sternalpunktat. Es ist aber wesentlich, daß man neben dem histologischen Bilde des Sternalpunktates jetzt auch das Verhalten des Knochenmarkes *in vitro* beobachten kann.

Die Züchtung von Geweben blutbildender Organe vom Tier ist besonders an den Namen *Maximow*, *Carrel*, *Lewis* und *Lewis*, *Chlopin*, *Erdmann*, *Timojejewsky*, *Barla* und *de Haan* geknüpft. Es sind dies grundlegende Arbeiten, die zu ihrem Teil zur Erkennung des hämatopoetischen Systems in der Gewebezüchtung beigetragen haben. Wir müssen jedoch bei aller Würdigung der vergleichenden mikroskopischen Anatomie fordern, daß zum Vergleich pathologischen menschlichen Gewebes normales menschliches Gewebe verwandt wird. Diese Gründe zwangen uns zu einer nochmaligen genauen Analyse des *in vitro* wachsenden Markes.

Die Gewebezüchtung an einer Medizinischen Klinik hat ihre besonderen Ziele und ihre besonderen Aufgaben. In den Vordergrund ihrer Betrachtung stellt sie nicht ausschließlich das morphologische Verhalten von Zellen und Zellgruppen, sondern wertet vor allem funktionelles Verhalten und Funktionsänderungen. Die Morphologie gilt dabei nur soweit, als man aus ihr Schlüsse auf den Funktionszustand ziehen kann. Wir haben deshalb zunächst bewußt darauf verzichtet, Fixierungen und Färbungen an unserem Material vorzunehmen, weil wir, worauf schon *A. Fischer* hinweist, zu der Feststellung gezwungen waren, daß aus dem fixierten gefärbten Präparat nur sehr schwer Beziehungen zum lebenden Gewebe gefunden werden können. Erst wenn wir uns durch eine genügend große Anzahl von Untersuchungen eine genaue Kenntnis über das Verhalten des lebenden Gewebes angeeignet haben, wenn es uns möglich ist, in bestimmten Grenzen eine Zellanalyse ungefärbt und unfixiert auszuführen, wollen wir zur Stabilisierung unserer Befunde die färberischen Methoden anwenden. Der zweiten und dritten Mitteilung soll dies vorbehalten sein.

Bestimmend für das Wachstum menschlichen Knochenmarks *in vitro* sind exogene und endogene Faktoren. Unter exogenen Faktoren

verstehen wir das Milieu, in das das Explantat zum Wachstum eingesetzt wird. Die endogenen Faktoren sind die Potenzen, die im Knochenmark durch Alter und Krankheit des Patienten enthalten sind. Knochenmark des älteren Menschen, das fetthaltiger ist als das des jungen, wächst im allgemeinen schlechter an und hat vor allem eine sehr starke Tendenz, das Plasmagerinnsel zu verflüssigen. Der starken Plasmolyse kann man dadurch begegnen, daß die deckende Plasmaschicht dicker gewählt wird. Man kann entweder sofort eine größere Menge Plasma als Deckschicht über die Kultur geben oder gibt wiederholt in den ersten Tagen nach dem

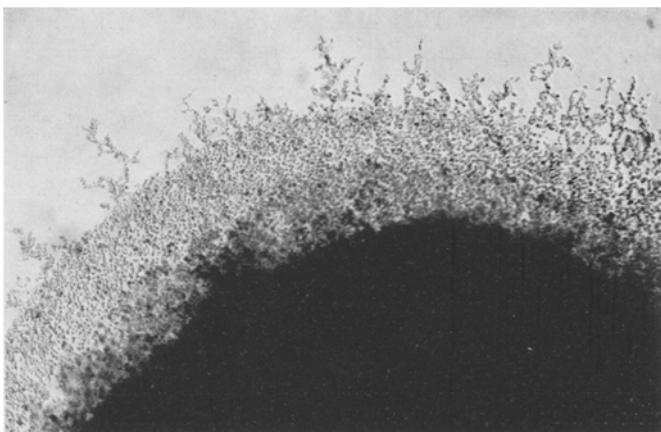


Abb. 1. Übersichtsbild. Bizarre Anordnung der ausgewanderten Zellen, an manchen Stellen kann man zwischen den farblosen, Zellen mit dunklerem Protoplasma erkennen.

Ansetzen eine gleich dünne Deckschicht wie am Tage des Ansetzens über die Kultur.

Wie konnten beobachten, daß Knochenmark von Patienten mit chronischen Erkrankungen, wie Tuberkulose, länger bestehendem Empyem, ein anderes Auswachsen zeigt als das von Patienten, die an anderen als diesen Erkrankungen leiden. Früher als wir diese Umstände weniger in Betracht zogen und ihnen noch nicht diese Bedeutung beimaßen, fiel uns die Vielzahl der Erscheinungen des wachsenden Knochenmarks auf, für die wir anfangs keine rechte Deutung hatten. Unter Berücksichtigung dieser Einflüsse konnten wir eine Ordnung und Gesetzmäßigkeit feststellen, die sich unter bestimmten Bedingungen immer wiederholen.

Das in das Plasmagerinnsel eingepflanzte Knochenmark zeigt frühestens am zweiten, spätestens am vierten Tage „Wachstum“, d. h. es wandern in mehr oder weniger starkem Maße Zellen in das Plasmagerinnsel aus. Es sind dies, wie Oxydasereaktionen ergeben, vorwiegend Zellen der myeloischen Reihe. Im Beginn der Auswanderung des Wachstums kann man zwei bestimmte Formen unterscheiden: Die eine besteht in einem

echten Auswandern und in einem Vorschieben der peripher gelegenen Zellen durch nachdrängende, die mehr dem Zentrum des explantierten Stücks zu gelegen sind. Die ausgewanderten Zellen umgeben in breitem Saum das angesetzte Stück. Dieses gleichmäßige, wallartige Vorschieben der emigrierenden Zellen finden wir immer beim Knochenmark von Patienten, die nicht an einer Erkrankung der blutbildenden Organe und an keiner chronischen Erkrankung leiden. Das Auswachsen kann sich aber auch statt dessen in einer anderen Form vollziehen. Es

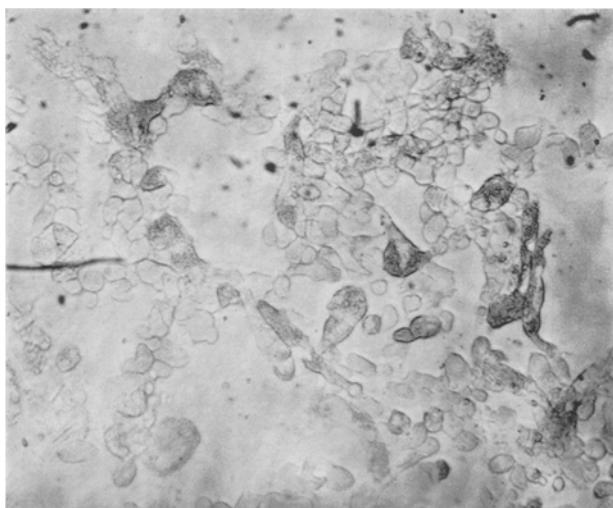


Abb. 2. Weiterentwicklung von Abb. 1. Die dunklen feingranulierte protoplasmatischen Zellen in beginnender Phagocytose der sie umgebenden Blutzellen, in mancher sind 1 bis 2 Vakuolen erkennbar. Vergr. 270mal.

findet keine gleichmäßige Rundzellenemigration statt, sondern vom Zentralstück strahlen baumartige bizarre Formen mit Verzweigungen aus, die bei stärkerer Vergrößerung in bestimmten Zügen aneinander gereihte zellige Elemente aufweisen (Abb. 1). Bei Untersuchungen mit starken Vergrößerungen fällt auf, daß an vielen Stellen dieser bizarren Formen die Zellgrenzen nicht mehr deutlich erkennbar sind. Es kommt hier zu syncytialen Zellverbänden, die später, wenn sie von der Umgebung losgelöst sind, als vielkernige Riesenzellen imponieren können. Diese zweite Form des beginnenden Knochenmarkwachstums finden wir vorwiegend beim Knochenmark von Patienten, die an chronischen Erkrankungen, in unseren Fällen meist an lang dauernder Tuberkulose leiden. Man möchte sagen, daß das Auswachsen des Knochenmarks für diese Fälle spezifisch ist.

Sowohl in den Kulturen, in denen es zu einer Auswanderung rundzelliger Elemente mit breitem Saum um das Zentralstück, wie auch in denen,

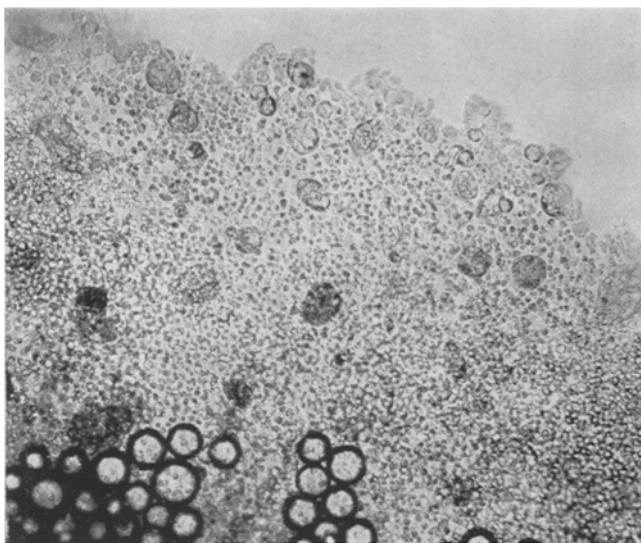


Abb. 3. Kultur etwa 2 Wochen alt. Die phagocytierenden Zellen sind erheblich größer
Bestreben vom Zentralstück nach der Peripherie sich fortzubewegen. Vergr. 86mal.

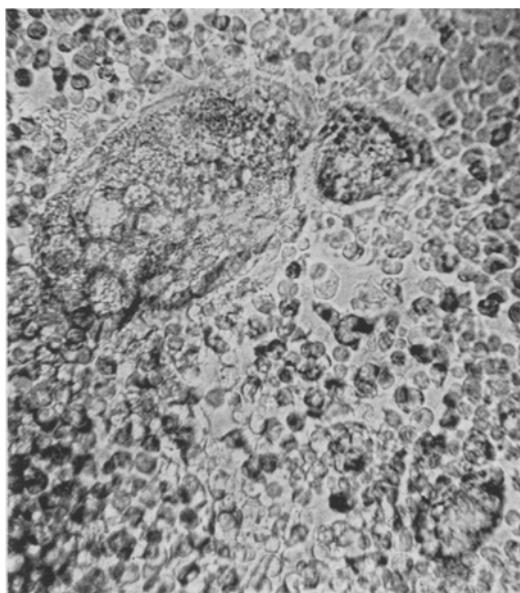


Abb. 4. Dasselbe wie Abb. 3. Vergr. 270mal. Besondere große Zelle 2 Tage später
aufgenommen als die Zellen der Abb. 3.

wo sich das beginnende Wachstum in bizarren baumartigen Verzweigungen zeigt, kann man vom 5. Tage an nach dem Ansetzen eine bestimmte Zellgruppe erkennen. Im lebenden Gewebe sieht man eine mehr oder weniger große Anzahl Zellen von meist rundlicher oder ovaler, aber auch polygonaler Form, die in dieser Zeit fast die gleiche Größe haben, wie die sie umgebenden Zellen und die nur deswegen auffallen, weil ihr Protoplasma dunkler erscheint. Bei starker Vergrößerung erscheinen sie als mononukleäre mit einem großen und hellen Kern. Das Protoplasma weist eine feine Granulierung auf und kann gelbbräunlich bis schwarz

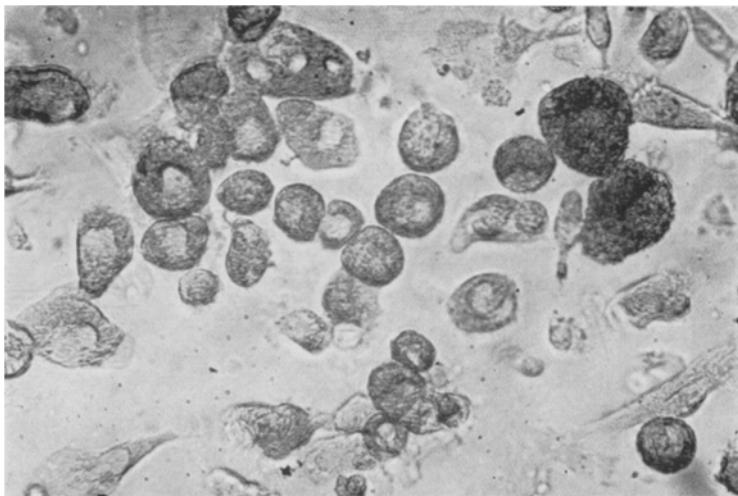


Abb. 5. Zellen des 3. Stadiums. Besonders stark verdichtetes Protoplasma. Zellen sind etwas kleiner geworden. Vergr. 530mal.

gefärbt erscheinen. Diese Zellen umfließen die sie umgebenden Blutzellen und phagocytieren sie (Abb. 2). Bei ständiger Beobachtung sieht man ein auffallend rasches Wachstum dieser Zellen. In 3—5 Tagen können sich diese umgebenden Zellen um ein Vielfaches, in extremen Fällen um ein 20—50faches übertreffen. Sie bekommen Form und Gestalt von Riesenzellen. Man möchte sie als Giganten unter den ausgewanderten Zellen bezeichnen. Besonders bezeichnend für sie ist die starke Neigung zur Phagocytose. Einige Zellen sind vollgepfropft mit Leukocyten und Erythrocyten (Abb. 3 und 4).

Ungewöhnlich am 10.—14. Tage sieht man diese Riesenzellen ziemlich vereinzelt, meist rund oder oval und anscheinend ohne Verbindung miteinander verstreut in der Peripherie liegen. Sie sind kleiner geworden, ihr Cytoplasma erscheint nicht mehr so dunkel, es ist heller und hat einen mehr gelblichen Farbton. Das Protoplasma ist dichter, eine Granulierung ist meist nicht mehr zu erkennen. Die Struktur des Protoplasmas ist

jetzt schollenartig. Die Zellen sind einkernige, meist mit 2 oder 3 großen Vakuolen (Abb. 5). Wendet man vitale Färbungsmethoden an, wie die Färbung mit Janusgrün (1 : 200 000), so kann man feine protoplasmatische Ausläufer erkennen, die sich in die Umgebung erstrecken und dort, wo sie auf Ausläufer derselben Zellen treffen, sich mit diesen verbinden. Es entsteht so ein großes weitmaschiges Netz (Abb. 6). In den Lücken dieses Netzes liegen Zellen der myeloischen Reihe. Je älter diese Zellen werden, um so mehr verlieren sie ihre runde oder ovale Form.

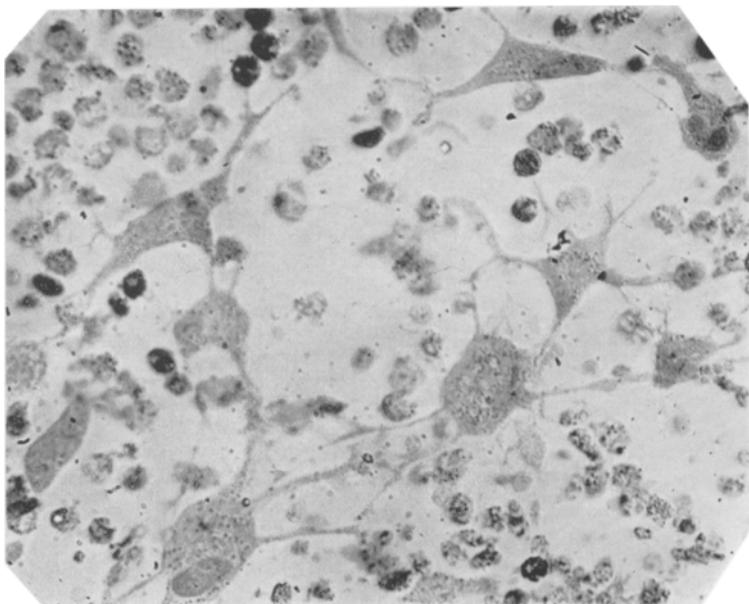


Abb. 6. Vitalfärbung mit Janusgrün (1:200 000). Netzförmige, protoplasmatische Verbindungen der Zellen untereinander, die ungefärbt nicht erkennbar sind. Vergr. 530mal.

Der Zelleib streckt sich, er wird spindelig. Die Ausläufer bilden sich vorwiegend an den Spindelspitzen, besonders an denen, die zur Peripherie hinzeigen. Mit dem Alter zeigt das Protoplasma nicht nur schollenartigen Charakter, sondern auch feinkörnige Granulierung. In manchen Zellen ist das Protoplasma mit groben, lichtbrechenden Granula angefüllt. Meist ist die grobe Granulierung im späteren Stadium nicht mehr anzutreffen. In einigen Zellen ist sie jedoch bis zur fibrocytären Umwandlung erhalten. Es sind dies die Zellen, die am nächsten dem Zentralstück zu gelegen waren. Es war uns schon bei unserer ersten Arbeit eine Zellgruppe aufgefallen, die in Begleitung von Fettzellen zu finden war und deren Protoplasma gröbere lichtbrechende Granulierungen enthielt. Diese Zellen behalten ihre grobe Granulierung bis in die spätesten Stadien der fibrocytären Umwandlung bei. Man kann dann deutlich verfolgen,

wie die Granulierung in den neu sprossenden Ausläufern noch vorhanden ist. Sie verliert sich allmählich, denn wir haben sie in den Fibroblasten nicht in derselben Intensität bestehen bleiben oder auftreten sehen. Diese Granulierung spielt beim Wachstum der Zelle eine besondere Rolle und ist das Kennzeichen für einen bestimmten Zustand des Stoffwechsels.

Man kann den Wechsel der Struktur dieser Zellen und ihr verschieden funktionelles Verhalten in 4 Stadien einteilen:

1. Stadium der Emigration. Eine nur etwas größere Zelle als die Blutzelle von rundovaler, aber auch polygonaler Form, mit dunkel getöntem Protoplasma, nach der Peripherie auswandernd. Sie hebt sich vor allem durch ihr dunkles Cytoplasma von den übrigen Knochenmarkszellen ab. Das Cytoplasma besteht aus einer sehr dichten feinkörnigen Granulierung.

2. Stadium der Phagocytose. Die Granulierung ist nicht deutlich zu erkennen. Der Zelleib ist riesig angeschwollen und vollgepfropft mit rundzelligen Elementen. Die Riesenzellen können die Blutzellen in ihrer Größe um das 20—50fache übertreffen.

3. Stadium der Netzbildung in der Gewebskultur. Die Riesenzellen sind kleiner geworden, das Protoplasma hat ein brockenschollenartiges Aussehen bekommen, ist teilweise feingekörnt, die Zelle ist einkernig. Bildung eines Netzes in der Peripherie der Kultur durch Aussenden protoplasmatischer Ausläufer.

4. Stadium der Umwandlung. Die Zellen wandeln sich in der Übergangsform zu fibrocytären Elementen um. In einzelnen Zellen grobe, lichtbrechende Granulierung.

Die Zellen des 4. Stadiums sind nicht mehr rund. Meist sieht man polygonale, zuweilen spindelige Formen (Abb. 7, 8). Die Zellen zeichnen sich vorwiegend durch Längenwachstum aus, nehmen zuletzt spindeligen Charakter an und sind von den sonstigen Fibrocyten der Kultur anfangs noch durch ihre plumpe, breite Form, später nicht mehr sicher zu unterscheiden.

Interessant erschien uns der intermediäre Stoffwechsel dieser Zellen, den wir durch Strukturänderungen des Protoplasmas in langwierigen Beobachtungen haben untersuchen können. Die feinkörnige Granulierung lässt sich durch Nilblausulfat färben. Die Färbung ergibt ungefähr



Abb. 7. Stärker gestreckte Zelle mit gut erkennbarer großer Vakuole und dunklem Kern mit brockenartiger Anordnung des Chromatins.
Vergr. 530mal.

am 6.—7. Tag sehr dichte blaugefärbte Granulabildung bei einer Verdünnung von 1:250 000, die später nur noch ganz schwach rosa erscheint, um im Stadium II manchmal in Spuren, im Stadium III nicht mehr nachweisbar zu sein. Wir haben immer dann, wenn ein besonders reger Stoffwechsel in den Zellen stattfand, auch eine besonders starke Granulierung beobachten können, die für gewöhnlich nach einiger Zeit zu verschwinden pflegt, meist nach 6—8 Tagen. Es erscheint uns wahrscheinlich, daß die Verdichtung des Protoplasmas, wie die auch später in manchen Zellen auftretende grobe Granulierung, als ein Zeichen protoplasmatischen Stoffwechsels und Verdauung phagocytierter Elemente zu werten ist. *Schabad* und *Wolkoff* beobachteten eine vermehrte Lipoidspeicherung der Reticulumzelle

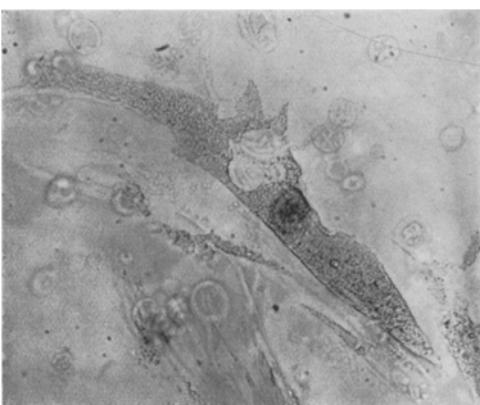
am Rande nekrotischer Herde. Sie sehen darin ein Zeichen der gut erhaltenen Reticulumzellen, denn die degenerierte hat die Fähigkeit, Lipoide zu speichern, verloren. Diese Tätigkeit wird von ihnen als etwas Spezifisches für die Reticulumzelle bezeichnet. Bei der

Anwendung von vitalen Farbstoffen konnten wir eine gute Färbung mit Janusgrün bei den von uns beschriebenen

Abb. 8. Umbildung zum Fibrocyten. Zelleib angefüllt mit groben, stark lichtbrechenden Granula.
Vergr. 530mal.

Zellen beobachten. Trypanblau wurde nur schlecht gespeichert. Andere Speicherungsfarbstoffe sind von uns nicht benutzt worden.

Es erscheint uns fraglos, daß die von uns beschriebenen Zellen Reticulumzellen darstellen. Die starke Neigung zur Phagocytose, die Lipoidspeicherung und die Bildung netzartiger Strukturen wie das grobvakuolige Protoplasma lassen diese Zellen als Reticulumzellen erkennen. In der Gewebskultur des Knochenmarks bilden sie sich zu fibrocytären Elementen um und sind in späteren Stadien, wenn die Kultur ein reines Fibrocytengewebe aufweist, nicht mehr von anderen Zellen zu unterscheiden. Zu der Auffassung, daß diese Zellen Reticulumzellen sein müssen, kamen wir nicht allein durch die morphologische Betrachtung dieser Zellen, sondern vor allem war für uns folgendes beweisend: In einem klinisch sicher gestellten Fall einer Retikulose erhielten wir Sternalpunktat zur Züchtung. Über die eingehende Untersuchung dieses Falles soll an einer anderen Stelle im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen des blutbildenden Systems berichtet werden. Wir fanden aber in diesen Kulturen ein Vorherrschen von oben beschriebenen Zellen, wie wir es in diesem



Maße bisher noch nicht gesehen hatten. Dies bestärkte uns vor allem in unserer Ansicht, daß diese Zellen als Abkömmlinge des retikulären Systems anzusprechen sind.

Wir können das *Ergebnis dieser Untersuchung* dahin zusammenfassen, daß es mit unserer Methodik der Zellzüchtung gelingt, aus dem menschlichen Knochenmark einen bestimmten Zelltyp zu züchten, der *in vitro* einen ganz bestimmten Werdegang durchläuft. Wir konnten diesen Werdegang in 4 Stadien einteilen. Die Lipoidbildung in den Zellen können wir nicht als einen degenerativen Vorgang auffassen, sondern als einen diesen Zellen in einem bestimmten Stadium eigentümlichen Stoffwechselvorgang, der im Zelleben von großer Bedeutung zu sein scheint. Mit Aufhören der Bildung von Granula in den Zellen geht fast gleichzeitig die Umbildung in fibrocytäre Elemente einher. In diesem letzten Stadium konnten wir nicht in einem einzigen Fall eine später auftretende Lipoidgranulierung beobachten. Kommt es zur Zellverfettung mit anschließendem Zelltod, so geht meist eine Auflösung des Zellverbandes voraus. Aus dem dichten Fibroblastengewebe lösen sich die Zellen als fast vollkommen runde Elemente, die meist großtropfig verfettet sind. Besteht die Lipoidgranulierung aus einer Unzahl nichtzählbarer kleinster Granula, so läßt sich die Zahl der Fetttropfen bei der zum Zelltod führenden Verfettung meist schon bei geringerer Vergrößerung erkennen.

Nach ihrem morphologischen wie funktionellen Verhalten glauben wir die von uns beschriebene Zellart genetisch von den Reticulumzellen des Knochenmarkes ableiten zu können.
